



日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2001年 9月28日

出 願 番 号

Application Number:

特願2001-303745

[ST.10/C]:

[JP2001-303745]

出 願 人

Applicant(s):

花王株式会社

2002年 1月22日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2002-3000456

【書類名】 特許願

【整理番号】 P04361309

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12P 19/00

【発明者】

【住所又は居所】 栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2 6 0 6 花王株式会社研究所
内

【氏名】 五十嵐 一暁

【発明者】

【住所又は居所】 栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2 6 0 6 花王株式会社研究所
内

【氏名】 尾崎 克也

【特許出願人】

【識別番号】 000000918

【氏名又は名称】 花王株式会社

【代理人】

【識別番号】 100068700

【弁理士】

【氏名又は名称】 有賀 三幸

【選任した代理人】

【識別番号】 100077562

【弁理士】

【氏名又は名称】 高野 登志雄

【選任した代理人】

【識別番号】 100096736

【弁理士】

【氏名又は名称】 中嶋 俊夫

【選任した代理人】

【識別番号】 100089048

【弁理士】

【氏名又は名称】 浅野 康隆

【選任した代理人】

【識別番号】 100101317

【弁理士】

【氏名又は名称】 的場 ひろみ

【選任した代理人】

【識別番号】 100117156

【弁理士】

【氏名又は名称】 村田 正樹

【選任した代理人】

【識別番号】 100111028

【弁理士】

【氏名又は名称】 山本 博人

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 特願2001- 27055

【出願日】 平成13年 2月 2日

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 011752

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9707531

【包括委任状番号】 9913446

【包括委任状番号】 0018724

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 グルコースー１ーリン酸の製造法

【特許請求の範囲】

【請求項１】 コリネバクテリウム属細菌を糖及び 1 mM以上のリン酸類又はその塩を含有する培地中で培養し、培地中に生成蓄積されたグルコースー１ーリン酸を採取するグルコースー１ーリン酸の製造法。

【請求項２】 コリネバクテリウム属細菌が、コリネバクテリウム・カルナエ (*Corynebacterium callunae*)、コリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) 及びコリネバクテリウム・ビタエルミニス (*Corynebacterium vitaeruminis*) から選ばれる請求項 1 記載のグルコースー１ーリン酸の製造法。

【請求項３】 コリネバクテリウム属細菌が、コリネバクテリウム・カルナエ I F O 1 5 3 5 9 株、コリネバクテリウム・グルタミカム J C M 1 3 2 1 株及びコリネバクテリウム・ビタエルミニス J C M 1 3 2 3 株から選ばれる請求項 2 記載のグルコースー１ーリン酸の製造法。

【請求項４】 糖が、グルコースを構成糖として含有する単糖、二糖、オリゴ糖及び多糖類から選ばれた一種以上である請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項記載のグルコースー１ーリン酸の製造法。

【請求項５】 リン酸類又はその塩の濃度が、1 mM～1 Mである請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項記載のグルコースー１ーリン酸の製造法。

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1 】

【発明の属する技術分野】

本発明は、微生物を用いたグルコースー１ーリン酸の製造法に関する。

【 0 0 0 2 】

【従来の技術及び発明が解決しようとする課題】

グルコースー１ーリン酸(以下、「Gー１ーP」と略称する)は、医薬品及び糖合成の基質として有用である。

Gー１ーPは、主にマルトデキストリンホスホリラーゼ (M D P a s e) によ

って、澱粉及びデキストリン類を加リン酸分解することによって得られるが、これまでに、馬鈴薯由来のMDPaseを利用する方法（特公平6-95492号公報）や微生物由来のMDPaseを用いるいわゆる酵素法が報告されている。

【0003】

微生物由来のMDPaseを用いる酵素法としては、例えば、エッシェリヒア・コリ（*Escherichia coli*）由来の酵素を用いる方法（*Enzyme Microb. Technol.*, 17, 140-146(1995)）、コリネバクテリウム・カルナエ（*Corynebacterium callunae*）由来の酵素を用いる方法（*J. Carbohydrate Chem.*, 14, 1017-1028(1995)）が報告され、さらに最近では、バチルス・ステアロサーモフィルス（*Bacillus stearothermophilus*）（特開平10-14580号公報）やサーマス・カルドフィルス（*Thermus caldophilus*）（*J. Industrial Microbiol.*, 24, 89-93(2000)）等の中度好熱菌や高度好熱菌の熱安定性MDPaseを利用してG-1-Pを製造する方法が報告されている。

【0004】

しかしながら、これらのような酵素自体を用いる酵素法では、植物や菌体より酵素を抽出する工程や固定化酵素の作製等の複雑な工程が必要とされ、より簡便にG-1-Pを製造する方法の開発が望まれていた。

【0005】

本発明は、煩雑な工程を要さず大量のG-1-Pを得ることができるG-1-Pの製造法を提供することを目的とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、培養により多量のG-1-Pを培地中に生産する菌を種々検討したところ、コリネバクテリウム属細菌を糖及び高濃度のリン酸類が存在する条件下で培養した場合に、高濃度のG-1-Pが直接培地中に生産され、G-1-Pの大量製造が可能であることを見出した。

【0007】

すなわち本発明は、コリネバクテリウム属細菌を糖及び1 mM以上のリン酸類又はその塩を含有する培地中で培養し、培地中に生成蓄積されたグルコース-1

ーリン酸を採取するグルコースー1ーリン酸の製造法を提供するものである。

【発明の実施の形態】

【0008】

本発明において用いられるコリネバクテリウム属細菌は、コリネバクテリウム属に属し、糖及び一定濃度のリン酸類又はその塩の存在下、培地中にグルコースー1ーリン酸を産生するものであればよく、例えばコリネバクテリウム・カルナエ (*Corynebacterium callunae*)、コリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*)、コリネバクテリウム・ビタエルミニス (*Corynebacterium vitaeruminis*)、コリネバクテリウム・ピロスム (*Corynebacterium pilosum*) 等が挙げられ、このうち、コリネバクテリウム・カルナエ、コリネバクテリウム・グルタミカム、コリネバクテリウム・ビタエルミニスが好ましく、中でもコリネバクテリウム・カルナエ IFO15359株、コリネバクテリウム・グルタミカム JCM1321株、コリネバクテリウム・ビタエルミニス JCM1323株が好ましい。

【0009】

培地に添加される糖としては、好ましくはグルコースを構成糖として含有する単糖、二糖、オリゴ糖及び多糖類が挙げられ、更に好ましくは α -1, 4グルカンを含む糖質、例えばデンプン、アミロース、デキストリン、マルトース、マルトオリゴ糖、アミロペクチン、グリコーゲン等が挙げられる。このうち、安価なデンプン、デキストリン、マルトオリゴ糖が特に好ましい。

斯かる糖は、これらの2種以上を混合して用いてもよい。

【0010】

培地に添加されるリン酸類又はその塩としては、例えばリン酸、メタリン酸、トリポリリン酸、ポリリン酸、二リン酸、ポリメタリン酸及びこれらの塩類が挙げられ、塩としてはナトリウム塩、カリウム塩が好ましい。特に好ましいリン酸類の塩としては、例えばリン酸一カリウム、リン酸二カリウム、リン酸一ナトリウム、リン酸二ナトリウム等が挙げられる。本発明においては、リン酸類とその塩又は数種のリン酸類の塩を混合して用いることが好ましい。

培地中のリン酸類又はその塩の濃度は、効果の点から1mM以上であることが

必要であるが、好ましくは 1 mM ~ 1 M の範囲、更に好ましくは 5 mM ~ 5 0 0 mM、特に 1 0 0 mM ~ 5 0 0 mM が望ましい。

【 0 0 1 1 】

本発明において用いられる培地は、コリネバクテリウム属細菌が生育できるものであればよく、上記の糖及びリン酸類又はその塩の他に、炭素源、窒素源、金属ミネラル類、ビタミン類等を含有する液体培地等が使用できる。

【 0 0 1 2 】

ここで、糖質以外の炭素源としては、例えば酢酸塩等の有機酸塩が挙げられ、窒素源としては、例えばアンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、炭酸アンモニウム、リン酸アンモニウム、酢酸アンモニウム等の無機及び有機アンモニウム塩、尿素、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、カゼイン加水分解物等の窒素含有有機物、グリシン、グルタミン酸、アラニン、メチオニン等のアミノ酸等が挙げられ、

金属ミネラル類としては、例えば塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マグネシウム、硫酸マンガン、硫酸亜鉛、炭酸カルシウム等が挙げられ、これらを単独で又は必要に応じ混合して用いればよい。

【 0 0 1 3 】

培養は、好氣的条件下で、微生物が十分に生育できる条件となるよう pH 及び温度を適宜調整して行われるが、通常 pH 5 ~ pH 8、温度 2 5 °C ~ 4 0 °C で 1 2 時間 ~ 9 6 時間で行われることが好ましい。

また培養方法は、振とう培養、醗酵槽による培養の他、休止菌体反応及び固定化菌体反応も用いることができる。

【 0 0 1 4 】

培地中に生成蓄積したグルコース-1-リン酸を採取する方法は、公知の方法従って行えばよく、例えば、菌体を分離除去し、遠心分離、限外ろ過、イオン交換、逆浸透膜、電気透析、塩析、晶析等を組み合わせることにより行われる。

【 0 0 1 5 】

かくして、本発明の方法によれば、高濃度の G-1-P を直接培地中に生産させることが可能であり、酵素を用いる酵素法と比較して煩雑な工程を行うことな

く、大量のG-1-Pを製造することができる。斯かる効果は、後記実施例で示すように、コリネバクテリウム属細菌と同様に菌体中にMDPaseを含有し、その比活性もコリネバクテリウム属細菌由来MDPase 5.3 unit/mg (J. Carbohydrate Chem., 14, 1017-1028(1995)) に対して4.2 unit/mgと同等であるバチルス属細菌由来MDPase (特開平10-14580号公報) においては殆ど認められず、コリネバクテリウム属細菌が有する特有の効果である。

【0016】

【実施例】

<G-1-Pの定量>

培地中のG-1-Pの定量は、Weinhausle (Enzyme Microb. Technol., 17, 140-146(1995)) の方法を一部改変し行った。

すなわち、96穴マイクロプレート上で適宜希釈したサンプル100 μ Lに酵素反応液 (100mM Tris-酢酸緩衝液 (pH 6.8)、2mM EDTA、10mM 硫酸マグネシウム、2mM NAD、10 μ M グルコース-1, 6-ニリン酸、1.2 unit/mL ホスホグルコムターゼ (ウサギ筋肉由来、ロシュダイアグノスティック社製)、1.2 unit/mL グルコース-6-リン酸脱水素酵素 (Leuconostoc mesenteroides 由来、ロシュダイアグノスティック社製)) を100 μ L加え、37℃で30分間保温した後、340nmの吸光度を測定した。

【0017】

実施例 1

種培養は、培地 (3.5%可溶性澱粉、3.0% Lablemco Powder (OXOID社製)、0.05%硫酸マグネシウム、0.04%リン酸一カリウム、0.1%リン酸二ナトリウム) にコリネバクテリウム・カルナエ (C. callunae) IF015359、バチルス・ズブチリス (B. subtilis) IF03037、バチルス・ズブチリス (B. subtilis) IF01372、バチルス・リケニフォルミス (B. licheniformis) JGM2505を一白金耳接種し、30℃で一晩振盪培養を行った。

主培養は、3.5%可溶性澱粉、3.0% Lablemco Powder (OXOID社製)、0.05%硫酸マグネシウムにリン酸濃度が10mM、20mM、40mMとなるように添加した培地上に上記の種菌を1%植菌し、30℃で5日間培養した。上清のG

－ 1 － P 濃度を測定した。結果を表 1 に示す。

【 0 0 1 8 】

【表 1】

G－ 1 － P 生産性 (g/L)

リン酸濃度	10mM	20mM	40mM
<i>C. callunae</i> IF015359	0.15	0.41	0.58
<i>B. subtilis</i> IF03037	<0.01	<0.05	<0.01
<i>B. subtilis</i> IF01372	0.03	<0.01	<0.01
<i>B. licheniformis</i> JGM2505	0.07	0.01	0.01

【 0 0 1 9 】

実施例 2

種培養は、培地（3. 5 % 可溶性澱粉、3. 0 % Lablenco Powder (OXOID社製）、0. 0 5 % 硫酸マグネシウム、0. 0 4 % リン酸一カリウム、0. 1 % リン酸二ナトリウム）にコリネバクテリウム・カルナエ (*C. callunae*) IF015359、コリネバクテリウム・グルタミカム (*C. glutamicum*) JCM1321、コリネバクテリウム・ビタエルミニス (*C. vitaeruminis*) JCM1323、バチルス・ズブチリス (*B. subtilis*) IF03037、バチルス・ズブチリス (*B. subtilis*) IF01372、バチルス・リケニフォルミス (*B. licheniformis*) JGM2505を一白金耳接種し、3 0℃で一晩振盪培養を行った。

主培養は、0. 6 7 % Yeast Nitrogen Base (Difco社製)、1 0 % デキストリン（ポテト、SIGMA社製）にリン酸カリウム緩衝液（pH 7. 0）濃度が1 0 0 mM、2 0 0 mM、4 0 0 mM、5 0 0 mMとなるように添加した培地に上記種菌を集菌後、 $OD_{600nm} = 1.0$ となるように植菌し、3 0℃で5日間培養した。上清のG－ 1 － P 濃度を測定した。結果を表 2 に示す。

【 0 0 2 0 】

【表 2】

G-1-P 生産性 (g/L)

リン酸濃度	100mM	200mM	400mM	500mM
<i>C. callunae</i> IF015359	2.1	5.1	12.7	12.7
<i>C. glutamicum</i> JCM1321	—	—	11.5	—
<i>C. vitaeruminis</i> JCM1323	—	—	13.0	—
<i>B. subtilis</i> IF03037	0.01	0.02	—	0.04
<i>B. subtilis</i> IF01372	0.02	0.03	—	0.02
<i>B. licheniformis</i> JGM2505	0.01	0.01	—	0.01

【 0 0 2 1 】

以上の結果、コリネバクテリウム属菌を用い、リン酸濃度を調製することにより濃度依存的に G-1-P を効率良く生産させることができた。

【 0 0 2 2 】

【発明の効果】

本発明の方法によれば、酵素法で必要とされる植物や菌体より酵素を抽出する工程や固定化酵素の作製等の複雑な工程を行うことなく、大量の G-1-P を製造することができる。

【書類名】 要約書

【要約】

【解決手段】 コリネバクテリウム属細菌を糖及び 1 mM以上のリン酸類又はその塩を含有する培地中で培養し、培地中に生成蓄積されたグルコース-1-リン酸を採取するグルコース-1-リン酸の製造法。

【効果】 酵素法で必要とされる煩雑な工程を行うことなく、大量の G-1-P を製造することができる。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 1 - 3 0 3 7 4 5
受付番号	5 0 1 0 1 4 4 6 1 1 3
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0 0 9 4
作成日	平成 1 3 年 1 0 月 3 日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成13年 9月28日
【特許出願人】	
【識別番号】	000000918
【住所又は居所】	東京都中央区日本橋茅場町 1 丁目 1 4 番 1 0 号
【氏名又は名称】	花王株式会社
【代理人】	申請人
【識別番号】	100068700
【住所又は居所】	東京都中央区日本橋人形町 1 丁目 3 番 6 号 共同ビル
【氏名又は名称】	有賀 三幸
【選任した代理人】	
【識別番号】	100077562
【住所又は居所】	東京都中央区日本橋人形町 1 丁目 3 番 6 号 共同ビル 有賀特許事務所
【氏名又は名称】	高野 登志雄
【選任した代理人】	
【識別番号】	100096736
【住所又は居所】	東京都中央区日本橋人形町 1 - 3 - 6 共同ビル 有賀特許事務所
【氏名又は名称】	中嶋 俊夫
【選任した代理人】	
【識別番号】	100089048
【住所又は居所】	東京都中央区日本橋人形町 1 - 3 - 6 共同ビル 有賀特許事務所
【氏名又は名称】	浅野 康隆
【選任した代理人】	
【識別番号】	100101317
【住所又は居所】	東京都中央区日本橋人形町 1 丁目 3 番 6 号 共同

次頁有

認定・付加情報（続き）

【氏名又は名称】	ビル 有賀特許事務所
【選任した代理人】	的場 ひろみ
【識別番号】	100117156
【住所又は居所】	東京都中央区日本橋人形町 1 丁目 3 番 6 号 共同 ビル 有賀特許事務所
【氏名又は名称】	村田 正樹
【選任した代理人】	
【識別番号】	100111028
【住所又は居所】	東京都中央区日本橋人形町 1 丁目 3 番 6 号 共同 ビル 有賀特許事務所
【氏名又は名称】	山本 博人

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [0 0 0 0 0 0 9 1 8]

1. 変更年月日 1 9 9 0 年 8 月 2 4 日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都中央区日本橋茅場町 1 丁目 1 4 番 1 0 号

氏 名 花王株式会社